研究论文

动物食品中去甲基睾丸酮的纳米增强酶联免疫分析方法

刘春丽[1,2]，宋珊珊[1,2]，刘丽强[1,2]，张 鹏[1,2]，彭池方[*1,2]
（1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要：作者通过辣根过氧化物酶标记抗体（HRP-IgG）蛋白分子固定在金纳米粒子（GNP）表面的方法，制备得到一种高活性的酶-金纳米复合物（HRP-IgG-GNP）。将该 HRP-IgG-GNP 应用于酶联免疫分析（ELISA）方法中，针对去甲基睾酮（NT），建立了一种高灵敏的纳米增强 ELISA 方法。该方法的检测灵敏度达到 0.01 ng/mL，线性范围为 0.03~10 ng/mL。与传统 ELISA 方法相比，该方法的灵敏度提高了 10 倍。该纳米增强 ELISA 方法有望开发高灵敏免疫分析方法中获得广泛应用。

关键词：去甲基睾酮；金纳米粒子；纳米增强酶联免疫分析
中图分类号：TL 27115　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)06—0656—05

A Nanoparticle-Enhanced ELISA Against Nortestosteron in Animal-Original Food

LIU Chun-li[1,2]，*SONG Shan-shan*[1,2]，*LIU Li-qiang*[1,2]，*ZHANG Peng*[1,2]，*PENG Chi-fang*[*1,2]
(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Conjugating enzyme with nanoparticles is an effective approach to enhance the characteristics of enzyme molecule in biosensor. A highly active enzyme-nanoparticle complex, HRP-IgG GNP, was prepared by immobilizing horseradish peroxidase labeled antibody (HRP-IgG) onto the surface of gold nanoparticle (GNP). The HRP-IgG GNP complex was applied to the enzyme-linked absorbent immunoassay (ELISA) and a highly sensitive nanopaticle-enhanced ELISA method was developed against nortestosterone (NT). The sensitivity of the novel method reached 0.01 ng/mL and the linear range was 0.03~10 ng/mL. the nanopaticle-enhanced ELISA method was 10 times more sensitive than the traditional ELISA method. The above method has promising applications for developing highly sensitive immunoassay methods.

Keywords: nortestosterone, gold nanoparticle, nanopaticle-enhanced ELISA

收稿日期：2012-05-30
基金项目：教育部博士点新教师基金项目(20110093120003)；江南大学大学生实践创新项目。
* **通信作者**：彭池方(1975—)，男，湖北荆州人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事食品安全检测与控制方面的研究。
E-mail: pcf2125@yahoo.com.cn

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

去甲基睾酮（nortestosterone，NT），简称诺龙，是一种合成甾体激素，具有雄激素样作用的同化激素[1]。临床主要用于治疗贫血、老年性骨质疏松、恶病质及男性避孕药的研究等。由于 NT 具有很强的促蛋白合成作用，也被非法用于运动员以提高运动成绩和动物饲料添加剂[1-2]。去甲睾酮作为动物饲料添加剂会在食用动物的肝、肾等组织中残留，过量摄入高残留的 NT 的动物组织后可产生激素样作用，如破坏人机体的激素平衡、干扰人的内分泌功能、影响生育能力、发育毒性（儿童早熟和女性男性化），可导致糖尿病，高剂量积累甚至可诱导心血管疾病[3-4]。

已有许多用于 NT 检测的方法报道，包括气相色谱-质谱、液相色谱-质谱方法[5-6]。色谱-质谱联用是一种非常灵敏和准确的激素药物检测方法，但是这些方法需要高技能的操作人员，离不开昂贵的大型设备和大型的实验室，而且其检测是一个冗长繁琐的过程。因此，这些弱点限制了这类方法的应用。免疫分析能够克服以上色谱-质谱方法的不足，如作者所在研究室开发的检测 NT 的酶联免疫分析（ELISA）[7]、胶体金免疫层析检测[8-9]方法，具有测试操作简单、仪器廉价、速度快、样品检测通量高等优点，因此可应用于大量生物样品的筛选检测。最近有报道 NT 的单克隆抗体筛选成功[10]，并建立 NT 的免疫检测方法，将有利于该技术和产品的稳定供应。进一步提高以上方法的灵敏度，可在实际样品前处理采用高稀释倍数，从而降低样品基质的干扰，提高检测结果的重复性和准确性。作者利用金纳米粒子的高比表面积，采用酶标抗体修饰的金纳米粒子作为 ELISA 中的探针，建立了一种新型的基于纳米增强的酶联免疫分析方法。与传统 ELISA 方法相比，该方法的检测灵敏度提高了 10 倍。因此，该方法在免疫分析中具有诱人的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 氯金酸，柠檬酸钠、卵清蛋白（OVA）：均购自 Sigma 公司；去甲睾酮兔源抗体：作者所在实验室自制；辣根过氧化物酶标羊抗兔（HRP-IgG）：购自吉泰生物公司；三丁胺、氯甲酸异丁脂、羧甲基羟胺半盐酸：购自 TCI 化学公司。其他有机溶剂和无机盐均为分析纯。

1.1.2 仪器 酶标仪：热电仪器；Biomate6 微量分光光度计：热电科学；Nano ZS 动态激光散射仪：DLS，马尔文；H-800 透射电镜：TEM，日立公司。

1.2 人工抗原 NT-OVA 的制备

称取 275 mg（约 1 mmol）NT 溶于 10 mL 无水吡啶，然后加入 219 mg（约 2 mmol）羧甲基羟胺半盐酸，50 ℃搅拌反应 30 min。减压蒸馏去吡啶。残余物用 50~100 mL 乙酸乙酯溶解，加适量水洗 3~4 次。取上层油样，加入少量无水硫酸钠干燥。减压蒸馏去乙酸乙酯，残余物用乙醚重结晶。

采用混合酸酐法与卵清蛋白（OVA）偶联。所得产物用双蒸水（2 L）透析 2 d，每日更换缓冲液 4 次，最后两次用 PBS 透析，4 ℃下保存备用。

1.3 金纳米粒子的制备

取 100 mL 质量浓度为 0.1 g/dL 的氯金酸溶液，放入经王水充分洗涤的烧瓶（250 mL）中，搅拌下用油浴加热至沸腾，加入 2 mL 柠檬酸钠溶液（质量分数 1%），溶液变成酒红色后继续加热保持沸腾 20 min。测试所得金纳米溶液光吸收曲线，计算其浓度为 2 nmol/L[11]，同时透射电镜（TEM）观察其粒径和分散性。

1.4 酶标抗体-金纳米粒子偶联物的制备

配置质量浓度为 0.2 mg/mL 的酶标抗体（HRP-IgG）水溶液，取 100 μL 溶液，加入于 1 mL 胶体金溶液中，加入不同量的 200 mmol/L 的 K_2CO_3 溶液（0，1，2，3 μL），室温下避光振荡 1 h（500 r/min），4 ℃下静止 24 h。观察溶液颜色变化，并测试其 400~800 nm 范围光吸收曲线，取颜色无变化、光吸收曲线没有扩展的溶液。最终选择酶标抗体-胶体金（HRP-IgG-GNP）的制备条件为：0.1 mg/mL 酶标抗体，2 μL 的 K_2CO_3 溶液。

1.5 纳米金-酶标二抗的光谱和粒径分析

用微量分光光度计测试 400~800 nm 波长范围 GNP 和 HRP-IgG-GNP 的吸收光谱。采用 DLS 测试 3 种样品的平均粒径，每种样品测试 3 次，取平均粒径测试结果的平均值为各样品的水合粒径。

1.6 纳米增强酶联免疫法建立

与传统酶联免疫法的操作步骤相同[7]。首先采用 NT-OV（100 μL/孔）包被微孔板，PBST 洗液洗涤后，以 0.5% 的 OVA 封闭（200 μL/孔），洗液后得到敏化的微孔板，将其 4 ℃下干燥保存备用。向微孔中分别加入不同浓度的标准溶液（50 μL/孔）。以抗

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体稀释液稀释抗体(50 μL/孔),振荡 1 min 后,37 ℃孵育 30 min。洗液充分洗涤后,加入抗体稀释液稀释一定倍数的 HRP-IgG-GNP 复合物(100 μL/孔),37 ℃下孵育 15 min。洗涤后加入 TMB 显色液(100 μL/孔),37 ℃反应 15 min,加入 2 mol/L 硫酸(100 μL/孔)终止反应。酶标仪中检测 450 nm 处的光吸收值。

1.7 样品前处理

取经过确证未受 NT 污染的牛肉样品,每份 2 g,剪碎,采用高浓度 NT 标准溶液添加,添加标准溶液后,静置 30 min,得到 NT 质量浓度分别为 1、5、20 μg/mL 的模拟样品。向上述样品中加入 4 mL 缓冲液 PBS(pH 8.0,0.01 mol/L)和 1 mL 甲醇,高速下匀浆 2 min,5 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液,以 PBS (pH 8.0,0.01 mol/L) 缓冲液稀释 8 倍。在 ELISA 分析中,每个微孔加入 50 μL 的该样品溶液,所得结果对照校正曲线计算得到测试浓度。

2 结果与讨论

2.1 人工抗原 NT-OVA 分析

对 NT、OVA、NT-OVA 进行光谱扫描,结果见图 1。NT-BSA 的吸收光谱分别具有 NT 和 OVA 的吸收特征,并且由于在蛋白质结构上偶联了一定量的 NT 分子,导致了蛋白质特征峰的偏移,可以证明成功制备了人工抗原。

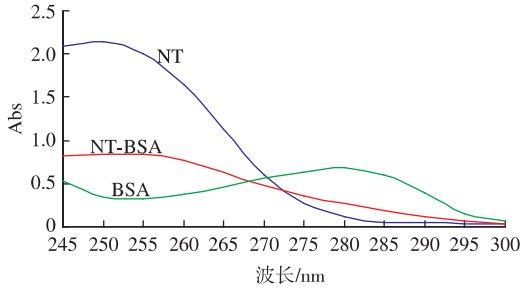

图 1 NT、OVA 和 NT-OVA 的紫外吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of NT、OVA and NT-OVA

2.2 HRP-SA-GNP 生物偶联物的表征

GNP 和纳米-酶复合物(HRP- IgG-GNP)的吸收光谱见图 2。由图 2 可知:GNP 的最大吸收峰为 518 nm,当前述条件下 GNP 表面吸附一定量的 HRP- IgG-GNP 后,最大吸收峰红移 11 nm,达到 529 nm。这与 GNP 随着粒径增大,其共振吸收峰红移的规律是一致的。

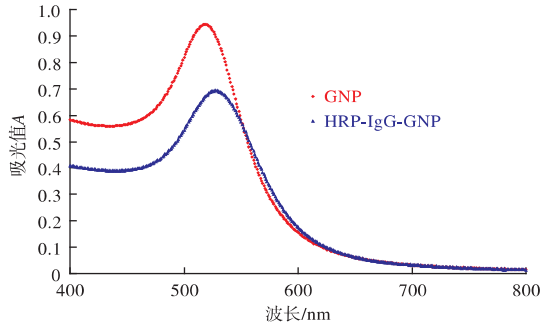

图 2 GNP 及 HRP-IgG-GNP 的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectrum of GNP and HRP-IgG-GNP

采用 DLS 分析 GNP 和 HRP- IgG-GNP 的粒径分布,比较 GNP 和 HRP- IgG-GNP 的水合分子半径,可以定性地观察 GNP 表面分子覆盖的程度,结果见图 3。计算 GNP 和 HRP- IgG-GNP 的粒径分布,平均水合粒径分别为 18 nm 和 33 nm。GNP 结合了 HRP- IgG-GNP 后,其粒径增加了 15 nm,与 HRP-IgG 的水合分子半径相近。这说明 HRP- IgG-GNP 与 GNP 的结合是比较紧密的,有利于其作为酶标记物的稳定使用。

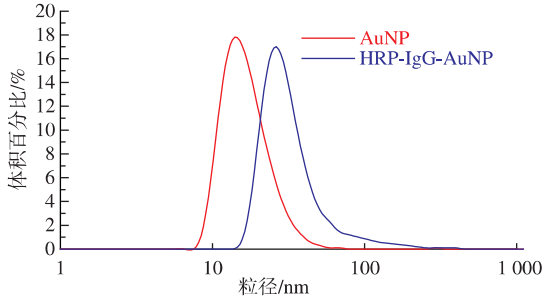

图 3 GNP 和 HRP-IgG-GNP 的粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of GNP and HRP-IgG-GNP

采用透射电镜(TEM)分析纳米金及其结合酶标二抗复合物,结果见图 4,可见柠檬酸还原法制备的 GNP 粒径为 16 nm 左右,粒径均一,分散性好,GNP 表面结合 HRP-IgG 后,仍然保持均一的粒径和单分散性。

2.3 纳米增强 ELISA 分析 NT

采用传统 ELISA 方法的溶液体系,经方正法选择抗原、抗体和酶标记物的质量浓度,质量浓度分别为 4.0 μg/mL 的 NT-OVA、1.2 μg/mL 的 NT 抗体,金纳米-酶标记物(HRP-IgG-GNP)的稀释倍数为 100 倍。对不同质量浓度的 NT 标准溶液检测结果见图 5。其检测灵敏度为 0.01 ng/mL(定义抑制率

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为 90%处,检测线性范围为 0.03 ~100 ng/mL (R^2= 99.3%),而传统 ELISA 方法的检测灵敏度为 0.1ng/mL,检测线性范围为 0.3 ~10 ng/mL(R^2=99.7%),两者相比,基于纳米增强的 ELISA 方法的灵敏度提高了 10 倍。以上结果说明,纳米金负载多个酶标二抗,显示出一定的放大效应,因此,作为新型的酶标二抗试剂应用于 ELISA 方法中,具有广泛的应用潜力。

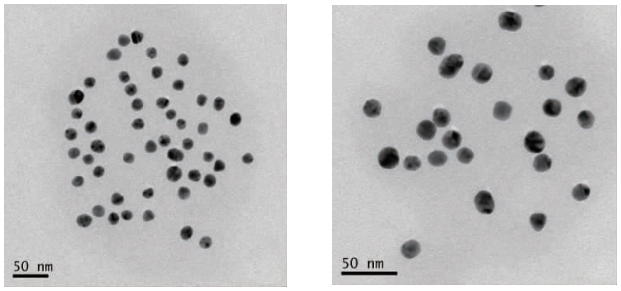

图 4 TEM 图:GNP (a)和 HRP-IgG-GNP (b)

Fig. 4 Transmission electron microscopy images of GNP (a) and HRP-IgG-GNP (b)

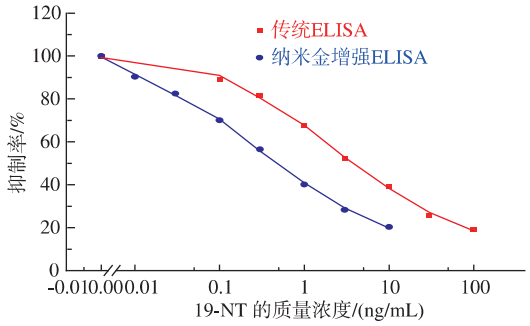

图 5 两种 ELISA 方法检测 NT 的校正曲线

Fig. 5 Calibration curve for the two ELISAs against NT

2.4 分析应用

在样品处理中采用了高稀释倍数的方法,对降低样品基质的干扰具有明显作用[11-12]。对残留范围 1.0~20 μg/kg 的牛肉样品,检测回收率可达到 87.8~96.2%,相对偏差小于 9%。相比传统 ELILSA 方法,检测结果的更准确、重复性更高[7,11]。

表 1 牛肉样品添加回收率的测定 (n=5)

Table 1 Recovery of NT in beef detected by the nanoparticle-enhanced ELISA

添加质量分数/(μg/kg)	检测质量分数/(μg/kg)	回收率/%	相对偏差/%
1.0	0.878 ± 0.076	87.8	8.7
5.0	4.81 ± 0.34	96.2	7.0
20	18.86 ± 1.55	94.3	8.2

3 结 语

通过简单的方法在纳米金表面负载 ELISA 检测中常用的酶标二抗分子,可得到更高活性的酶标二抗-纳米金复合物。该复合物具有单分散性和高催化活性等优点,将其应用于激素 NT 的 ELISA 检测中,可将传统 ELISA 方法的灵敏度提高 10 倍,同时改善检测的准确性和重复性。该方法有望在 ELISA 和其它免疫分析方法中获得广泛应用。

参考文献:

[1] Delbeke F T, Desmet N, Debackere M. The abuse of doping agents in competing body builders in Flanders (1988-1993)[J]. **Int J Sports Med**, 1995, 16(1): 66-70.

[2] Sauer M J, Samuels T P, Howells L G, et al. Residues and metabolism of 19-nortestosterone laurate in steers [J]. **Analyst**, 1998, 123(12): 2653-2660.

[3] Brannnvall K, Bogdanovic N, Korhonen L, et al. 19-Nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain[J]. **Eur J Neurosci**, 2005, 21(4): 871-878.

[4] Bahrke M S, Yesalis C E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise [J]. **Curr Opin Pharmacol**, 2004, 4(6): 614-620.

[5] Yamada M, Aramaki S, Kurosawa M, et al. Simultaneous doping analysis of main urinary metabolites of anabolic steroids in horse by ion-trap gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. **Anal Sci**, 2008, 24(9): 1199-1204.

[6] Grace P B, Drake E C, Teale P, et al. Quantification of 19-nortestosterone sulphate and boldenone sulphate in urine from male horses using liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 2008, 22(19): 2999-3007.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[7] Xu C L,Peng C F,Hao K,et al. Determination of 19-nortestosterone residue in aquaculture tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. **Intern J Environ Anal Chem**,2006,86(11):819-832.

[8] Liu L Q,Peng C F,Jin Z,et al. Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone[J]. **Biomed. Chromatogr**,2007,21(8):861-866.

[9] Tian Z,Liu L Q,Peng C F,et al. A new development of measurement of 19-nortestosterone by combining immunochromatographic stip assay and image software[J]. **Food Agric Immunol**,2009,20(1):1-10.

[10] Jiang J Q,Wang Z L,Zhang H T,et al. Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold immunoassay for detecting 19-nortestosterone residue in animal tissues[J]. **Agric Food Chem**,2011,59(18):9763-9769.

[11] Peng C F,Chen Y W,Wei C N,et al. Development of a sensitive heterologous ELISA method for analysis of acetylgestagen residues in animal fat[J]. **Food Chemistry**,2008,109(3):1647-653.

[12] 彭池方,沈崇钰,安可婧,等. 高效液相色谱-串联质谱联用测定脂肪中乙酰孕激素残留[J]. 分析化学,2008,36(8):1117-1120.
PENG Chi-fang, SHEN Cong-yu,AN Ke-jing. Analysis of acetylgestagens residues in animal fat by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. **Analytical Chemistry**,2008,36(8):1117-1120.(in Chinese)

[13] 王黎丽,陈芳芳,吴超,等. 基于单克隆抗体的三聚氰胺 ELISA 检测方法的建立[J] .食品生物技术学报,2011,31(6):962-967.
WANG Li-li,CHEN Fang-fang,WU Chao,et al. Establishiment of ELISA methods for detecting melamine based on monoclonal antibodies[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,31(6):962-967.(in Chinese)

科　技　信　息

加拿大公布乳制品、豆制品中三聚氰胺含量的调查结果

4 月 18 日,加拿大食品检验署(CFIA)公布了 2010-2011 年度乳制品、豆制品中三聚氰胺含量的调查结果。结果发现,所有的受检产品均安全,不会对消费者的健康构成威胁。

本次调查共抽取了来自 11 个城市的加拿大国产及进口产品中的 590 件样品,其中乳制品 302 件,豆制品 288 件。除了婴儿配方/谷物(粉),测试样品包括冷藏饮料牛奶、糖果、奶酪、牛奶、浓缩乳霜(冷藏随时可使用),牛奶、即时混合饮料、酸奶和调味料。测试的大豆制品包括冷藏和非冷凝大豆饮料/饮料、奶酪、面霜、豆奶、大豆、豆腐等。检测结果表明,所有牛奶、大豆产品中的三聚氰胺含量均低于加拿大三聚氰胺临时标准(2.5ppm)。所有的婴儿配方奶粉及米粉中均未检出三聚氰胺。

三聚氰胺是一种在商业与工业领域内应用的人工合成产品,并不会天然存在于环境与食品中,也禁止添加于食品中。然而由于化肥以及杀虫剂的使用,食品中可能会出现微量的三聚氰胺残留。

[信息来源]Canadian Food Inspection Agency. All Milk-Based and Soy-Based Product Samples Tested for Melamine Safe for Human Consumption [EB/OL]. (2013-4-18). http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/news-releases/2013-04-18/eng/1365615404545/1365615413753.

欧盟拟取消 1,3-二氯丙烯的最大残留限量

5 月 3 日,欧盟食品安全局就审查 1,3-二氯丙烯(1,3-dichloropropene)的最大残留限量发布了意见,建议取消其残留限量规定。

欧盟食品安全局认为,由于欧盟已停用 1,3-二氯丙烯,国际食品法典委员会也未制定 1,3-二氯丙烯的最大残留限量,而且 EFSA 也未收到进口限量通报,因此建议取消 1,3-二氯丙烯在动植物商品中的残留限量规定。

[信息来源]EFSA. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for dichlobenil according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2013;11(5):3218.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net